

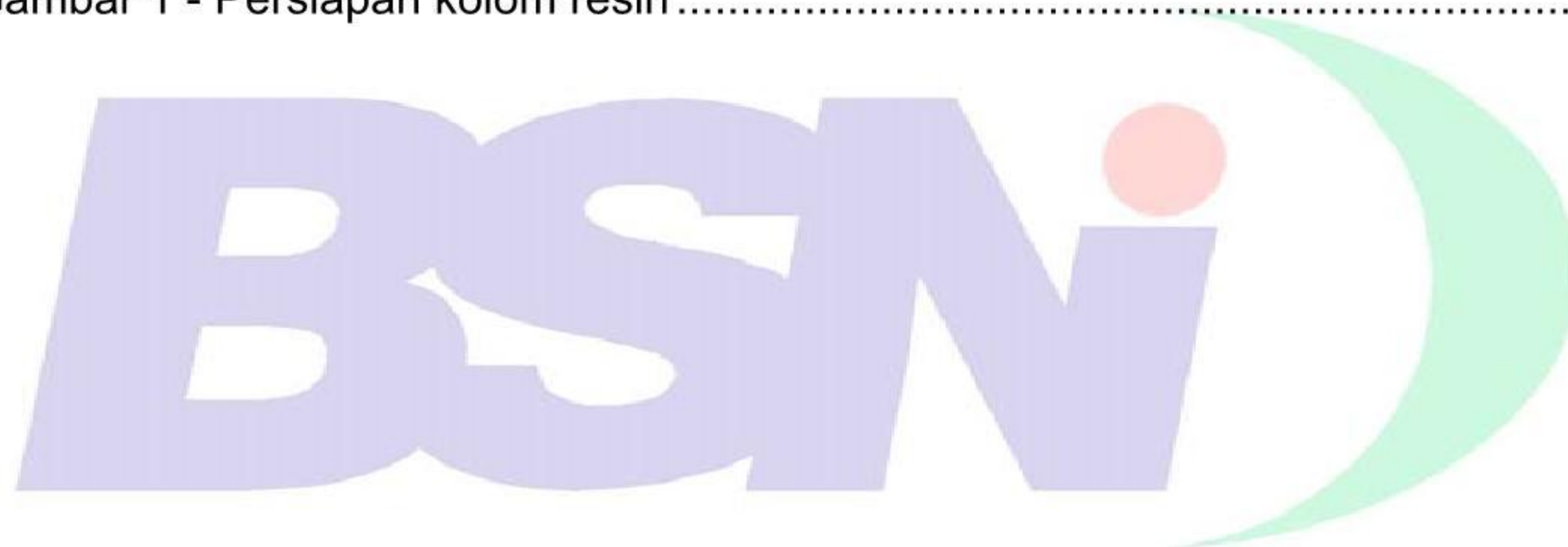
## **Cara uji kimia - Bagian 10: Penentuan kadar histamin dengan Spektrofluorometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan**





## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip metode pengujian .....	1
4 Penentuan histamin secara spektrofotometri .....	2
5 Penentuan histamin secara KCKT.....	4
6 Pelaporan .....	6
7 Keamanan dan keselamatan kerja .....	6
Bibliografi .....	7
Gambar 1 - Persiapan kolom resin .....	3





## Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 01-2360-1991 dan disusun oleh Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan. Standar ini dirumuskan melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 21 Desember 2006 di Bogor serta dihadiri oleh anggota Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

1. Undang-Undang No 31 tahun 2004 tentang Perikanan.
2. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 01/MEN/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. KEP. 21/MEN/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 16 Juli 2007 sampai dengan 16 Oktober 2007 dan pemungutan suara pada tanggal 21 Oktober 2008 sampai dengan 21 Januari 2009 dengan hasil akhir RASNI.



## Cara uji kimia - Bagian 10: Penentuan kadar histamin pada produk perikanan dengan Spektrofluorometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan

### 1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan kadar histamin pada produk perikanan.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### histamin

merupakan senyawa turunan dari asam amino histidin yang terbentuk karena tindakan bakteri yang memiliki *enzym dekarboksilase*

#### 2.2

##### fluorometri

metode analisa yang didasarkan pada pengukuran *fluorosensi*

#### 2.3

##### metode analisa secara KCKT

suatu teknik analisa kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi deferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase. Salah satunya adalah fase cair yang bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat terpisah menunjukkan perbedaan mobilitas karena perbedaan *absorpsi*, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul dan muatan ion

### 3 Prinsip metode pengujian

#### 3.1 Secara Spektrofluorometri

Histamin diekstrak dari jaringan daging contoh menggunakan metanol dan sekaligus mengkonversi histamin ke dalam bentuk OH. Zat-zat histamin selanjutnya dimurnikan melalui resin penukar ion dan diubah ke bentuk derivatnya dengan senyawa OPT. Besarnya *fluoresensi* histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 444 nm.

#### 3.2 Secara KCKT

Histamin diekstrak dari jaringan daging contoh menggunakan TCA 10 % selanjutnya diderivatisasi dengan senyawa *orto-ftalaldehid* (OPA). Besarnya histamin diukur secara KCKT dengan detektor *fluoresens* pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 450 nm dengan menggunakan fase gerak campuran *asetonitril* : larutan dapar monosodium fosfat (30 : 70) dan kolom C-18. Respon KCKT berupa puncak-puncak kromatogram yang mempunyai waktuambat (RT) yang spesifik. Identifikasi puncak dilakukan dengan membandingkan RT sampel terhadap RT standar. Luas puncak sebanding dengan jumlah analit tersebut.



## 4 Penentuan histamin secara spektrofotometri

### 4.1 Peralatan

- Corong dan botol *filtrat* contoh;
- Homogenizer* (blender);
- Kertas saring kasar, plastik, karet pengikat;
- Kolom resin 20 cm x 0,8 cm, *reservoir* 2 cm x 5 cm;
- Labu takar 25 ml, 50 ml, 100 ml dan 1.000 ml;
- Pipet *volumetric*;
- Spektrofotometer;
- Stirrer-plate*;
- Tabung reaksi 50 ml bertutup;
- Timbangan analitis;
- Waterbath*.

### 4.2 Pereaksi

- Metanol.
- Aquades.
- Glasswool*.
- NaOH 1 N;  
Larutkan 4 g NaOH dalam 100 ml aquades.
- HCl 0,1 N  
Encerkan 8ml HCl 12,5 N (37 %) dalam 1.000 ml aquades.
- Orto-ptalatdikarbosildehyd* (OPT) 0,1 %;  
Larutkan 0,1 g OPT dalam 100 ml metanol, larutan ini disiapkan pada kondisi segar dalam setiap analisa.
- Asam Fosfat ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 3,57 N;  
Encerkan 121,8 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %) menjadi 1.000 ml aquades, standarkan larutan ini dengan mengambil 5 ml dan titrasi dengan NaOH 1 N dengan indikator *fenolftalin*.
- Resin penukar ion jenis *Dowex 1 – X8 50 – 100 mesh*;
- Pembuatan larutan standard histamin:  
Larutan stok 1 mg/ml (1.000 ppm)  
Timbang teliti 169,1 mg histamin 2 HCl, larutkan dan tepatkan menggunakan HCl 0,1 N dalam labu takar 100 ml sampai batas volume. Siapkan larutan ini dalam kondisi segar setiap minggu dan disimpan dalam refrigerator.  
Larutan stok 10 µg/ml (10 ppm)  
Pipet 1 ml larutan *stock* (1.000 ppm) masukkan ke dalam labu takar 100 ml dan tambahkan larutan HCl 0,1 sampai batas volume. Siapkan larutan ini dalam kondisi segar setiap minggu dan disimpan dalam refrigerator.
- Larutan kerja;  
Buat larutan kerja 0,1 µg/ml (0,1ppm); 0,2 µg/ml (0,2 ppm) dan 0,3 µg/ml (0,3 ppm). Siapkan larutan kerja ini setiap hari (setiap akan digunakan). Apabila larutan kerja tersebut menghasilkan fluoresensinya yang maksimal pada pembacaan dengan instrumen, maka larutan kerja tersebut dapat diencerkan sesuai dengan keperluan.

### 4.3 Prosedur analisis

- blender contoh hingga homogen.
- timbang seksama lebih kurang 10 g contoh dalam *beaker glass* 250 ml dan tambahkan 50 ml metanol, blender hingga homogen.
- panaskan diatas *waterbath* selama 15 menit pada suhu 60 °C dijaga *sample* dalam kondisi tertutup, dinginkan hingga suhu kamar.



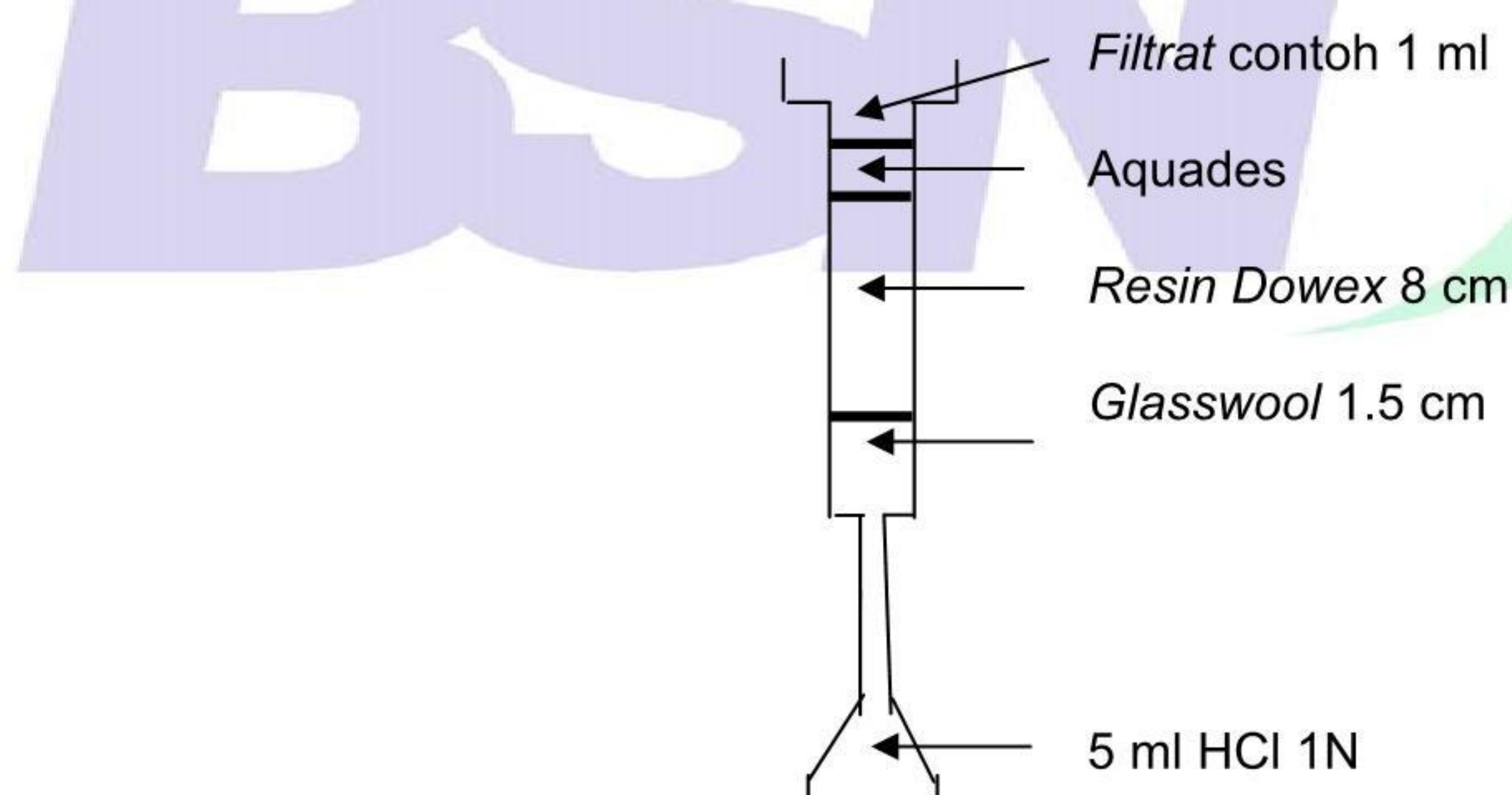
- d) tuangkan contoh ke dalam labu takar 100 ml dan tepatkan hingga volume labu dengan metanol.
- e) saring menggunakan kertas saring dan *filtratnya* ditampung dalam botol contoh. Pada tahap ini *filtrat* contoh dapat disimpan dalam refrigerator.

#### 4.3.1 Persiapan resin

- a) timbang 3 g *resin* untuk setiap kolom dalam *beaker glass* 250 ml.
- b) tambahkan 15 ml NaOH 2 N/g *resin* untuk mengubah *resin* menjadi bentuk OH.
- c) aduk menggunakan *stirer-plate* selama 30 menit.
- d) tuang cairan pada bagian atas dan ulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah yang sama.
- e) cuci/bilas *resin* dengan aquades sebanyak 3 kali.
- f) saring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan cuci kembali dengan aquades.
- g) siapkan *resin* setiap minggu dan simpan dalam aquades.

#### 4.3.2 Persiapan kolom resin

- a) masukkan *glasswool* kedalam kolom *resin* setinggi  $\pm 1,5$  cm.
- b) masukkan *resin* dalam medium air ke kolom resin setinggi  $\pm 8$  cm, pertahankan volume air yang berada diatas *resin*  $\pm 1$  cm, jangan dibiarkan kering.
- c) letakkan labu takar 50 ml yang sudah berisi 5 ml HCl 1 N dibawah kolom *resin* guna menampung *elusi* contoh yang dilewatkan pada kolom *resin*. Diperlihatkan dalam Gambar 1.



**Gambar 1 - Persiapan kolom resin**

#### 4.3.3 Pemurnian contoh

- a) pipet 1 ml *filtrat* contoh, masukkan dalam kolom *resin*, kran kolom *resin* dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 ml.
- b) tambahkan aquades pada saat tinggi cairan  $\pm 1$  cm di atas *resin* dan biarkan cairan terelusi. Lakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam labu takar tepat 50 ml. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam refrigerator.



#### 4.3.4 Pembentukan senyawa turunan (*derivatisasi*)

Siapkan tabung reaksi 50 ml masing-masing untuk contoh, standar dan *blanko*.

- pipet masing-masing 5 ml *filtrat* contoh, larutan standar kerja dan *blanko* (HCl 0.1 N)
- tambahkan kedalam tabung reaksi diatas berturut-turut:
  - 10 ml HCl 0,1 N, kocok.
  - 3 ml NaOH 1 N, kocok, dalam waktu 5 menit harus sudah ditambah 1 ml OPT 0,1%, kocok dan biarkan selama 4 menit.
  - 3 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3,57 N, kocok.
- lakukan pengukuran *fluoresence* terhadap contoh, standar dan *blanko* sesegera mungkin dengan alat spectrofluorometer pada panjang gelombang eksitasi: 350 nm dan emisi: 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

#### 4.4 Perhitungan

- Masukkan harga konsentrasi dan fluoresensi dari larutan standar kerja ke dalam program linier kalkulator. Nilai: koefisien korelasi *regresi* (r), *slope* (b) dari intersep (a) digunakan untuk menghitung konsentrasi contoh. Masukkan harga fluoresensi contoh ke persamaan regresi standar:

$$y = a + bx$$

**keterangan:**

- y : fluoresensi contoh;  
 a : intersep;  
 b : *slope*;  
 x : konsentrasi contoh yang akan dihitung.

- Setelah didapat harga x, kalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat contoh. Nyatakan kandungan histamin dalam (µg/g) atau mg/kg contoh.

$$\text{Konsentrasi histamin (}\mu\text{g/g) contoh} = A \times \frac{(\text{volume akhir (ml)} \times \text{fp})}{\text{gram contoh}}$$

keterangan:

A = Konsentrasi (X) yang didapat dalam perhitungan (µg/ml).

### 5 Penentuan histamin secara KCKT

#### 5.1 Peralatan

- Homogenizer;
- Membran filter 0,45 µm;
- Peralatan gelas. Gelas piala, tabung reaksi 50 ml, pipet, labu takar;
- Seperangkat peralatan KCKT dilengkapi dengan detektor fluoresen;
- Sentrifuga;
- Timbangan analitik;
- Ultrasonick bath*;
- Vortex*.

#### 5.2. Pereaksi

- Larutan Asam *Trikloroasetat* (TCA) 10 % untuk mengekstraksi contoh, 100g TCA larutkan dengan 1 l aquabides (sedikit demi sedikit hingga larut sempurna).



- b) Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10 % dalam air pro KCKT, Larutkan 10 gr TCA dalam 100 ml air pro KCKT kemudian saring dengan membran filter 0,45  $\mu$ m. Larutan ini digunakan untuk membuat dan mengencerkan larutan baku histamin.
- c) Air pro KCKT.
- d) Larutan OPA (*orto-ftalaldehid*), Larutkan 20 mg OPA dalam 2 ml metanol, dalam setiap analisa larutan ini dibuat segar.
- e) NaOH 1 N, larutkan 4 g NaOH dalam 100 ml air pro KCKT.
- f) HCl 3 N, Encerkan 12 ml HCl 12,5 N (37 %) dalam labu takar 50 ml.
- g) Asetonitril pro KCKT saring dengan membran filter PTFE.
- h) Larutan Natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Larutkan 0,3449 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dalam 300 ml air pro KCKT saring dengan membran filter 0,45  $\mu$ m, dalam setiap analisa larutan ini dibuat segar.
- i) Metanol pro KCKT.
- j) Larutan baku histamin.
- k) Larutan stok histamin 1 mg/ml (1.000 ppm). Timbang seksama lebih kurang 169,1 mg histamin tambahkan 2 ml HCl pekat, larutkan dan tepatkan menggunakan larutan TCA 10 % dalam labu takar 100 ml sampai batas. Simpan dalam refrigerator.
- l) Larutan baku 10  $\mu$ g/ml. Pipet 1 ml larutan stok (1.000 ppm) masukkan ke dalam labu takar 100 ml dan tambahkan larutan TCA 10 % sampai batas. Larutan ini dapat digunakan maksimal satu minggu setelah dibuat.
- m) Larutan baku kerja. Buat larutan kerja 2,5  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml dan 20  $\mu$ g/ml. Siapkan larutan baku kerja ini dalam keadaan segar setiap akan digunakan.

### 5.3 Prosedur analisis

- a) blender contoh hingga homogen.
- b) timbang seksama lebih kurang 50 g contoh ke dalam gelas piala, tambahkan 100 ml TCA 10 % kemudian blender.
- c) pindahkan kedalam tabung reaksi 50 ml, sentrifugal pada 3.500 rpm selama 10 menit. Saring supernatan dengan membran filter 0,45  $\mu$ m kemudian simpan pada suhu refrigerator ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ).
- d) Derivatisasi.
- e) pipet masing-masing 135  $\mu$ l larutan baku kerja dan *filtrat* contoh, masukkan kedalam tabung reaksi 10 ml.
- f) tambahkan masing-masing kedalam larutan baku kerja dan *filtrat* contoh berturut-turut :
  - 86 ml air pro KCKT kemudian *divortex*.
  - 0,4 ml NaOH 1 N, biarkan selama 1 menit.
  - 0,1 ml larutan OPA, *vortex* dan biarkan selama 4 menit.
  - 0,2 ml HCl 3 N, *vortex*.
- g) masukkan ke vial dan siap untuk diinjeksikan ke kromatograf.
- h) lakukan pengerjaan *blanko* 1,86  $\mu$ l Larutan Asam Trikloroasetat (TCA) 10% pengganti contoh dan dikerjakan seperti pengerjaan contoh.
- i) injeksikan kedalam *kromatograf* secara berurutan larutan *blanko* baku, baku kerja dari konsentrasi terendah, *blanko* pereaksi dan contoh. Rekam area puncak *kromatogram* utama dari masing-masing larutan yang diinjeksikan.

### 5.4 Kondisi KCKT

- a) Detektor : *fluoresens (high pressure xenon lamp)*.
- b) Eksitasi : 350 nm.



- c) Emisi : 450 nm.
- d) Kolom : C-18 (4,6 mm x 220 mm) terkemas dengan ukuran partikel 5 µm.
- e) Fase gerak : *asetonitril : Natrium dihidrogen fosfat* 50 mmol/l (30 : 70).
- f) Laju alir : 0,7 ml/menit.
- g) Volume injeksi : 20 µl.
- h) Pastikan peralatan KCKT berfungsi dengan baik dan lakukan uji kesesuaian sistem.

## 5.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Histamin } (\mu\text{g/g}) = \frac{(A_C - A_{BPr})}{(A_S - A_{ABs})} \times C_{\text{std}} \times V_A$$

W

### keterangan:

- $A_C$  : Area contoh;
- $A_{BPr}$  : Area *blanko* pereaksi;
- $A_S$  : Area baku;
- $A_{ABs}$  : Area *blanko* baku;
- $C_{\text{std}}$  : Konsentrasi baku (µg/ml);
- $V_A$  : Volume akhir (ml);
- $W$  : Berat contoh (g).

## 6 Pelaporan

- a) Jika angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan kebawah, tetapi bila lebih dari 5 (lima) pembulatan keatas.

### CONTOH:

14,454 dibulatkan menjadi 14,45  
14,466 dibulatkan menjadi 14,47

- b) Jika angka ke tiga di belakang koma 5 (lima), dan angka kedua genap, maka angka lima tersebut menjadi hilang tetapi bila angka kedua ganjil maka pembulatan keatas.

### CONTOH:

14,765 dibulatkan menjadi 14,76  
14,475 dibulatkan menjadi 14,48

## 7 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa.
- b) Gunakan jas laboratorium selama bekerja.



## Bibliografi

John M. Tennyson and R Steve Winlers, 2000, *Histamin in Seafood Fluorometric Method, Fish and Others Marine Products, Association of Official Analytical Chemists*, 17 th Ed, Chapter 35.1.32-p:17 s/d 19 USA

*Journal of Food Science* No. 4 Vol. 53, 1987 p. 925 – 927

*Journal of Liquid Chromatography* Volume 15, No. 13 Tahun 1992.























**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)